

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif. Penelitian ini bertujuan untuk mencari jumlah kadar kitinase parsial yang terkandung dalam masing-masing isolat jamur berdasarkan tingkat toksisitas jamur pada tahap uji mortalitas serangga hama. Hal ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas dari masing-masing jamur dalam memecah kitin. Jamur entomopatogen yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah *Beauveria bassiana*, *Trichoderma koningii*, dan *Aspergillus niger*. Jamur ini dipilih sesuai dengan tingkat toksisitas jamur, jamur yang terpilih memiliki tingkat toksistas yang paling tinggi, sedang, dan rendah. Kemudian dari ketiga jamur diatas akan dilihat aktivitas enzim secara dengan cara menumbuhkan jamur pada media kitin. Penumbuhan jamur pada media kitin juga dimaksudkan untuk memperoleh enzim kitinase yang berfungsi sebagai enzim pengurai kitin. Selanjutnya dilakukan ekstraksi enzim kasar yang berfungsi untuk mengetahui jumlah protein yang dihasilkan. Protein enzim kasar yang dihasilkan dilakukan penghitungan kadar menggunakan metode *bradford* (1968).

#### **3.2. Sampel Penelitian**

Sampel dalam penelitian ini berupa isolat jamur entomopatogen yang diisolasi langsung dari alam yaitu *Beauveria bassiana*, *Trichoderma koningii*, dan *Aspergillus niger*

#### **3.3. Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

##### **3.3.1. Alat**

Alat-alat utama yang rutin digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat standar yang biasa digunakan di laboratorium Mikrobiologi yaitu autoklave, laminar air flow, inkubator, inkubator bergoyang, spektrofotometri sinar tampak

(Uv – Vis), neraca digital, kotak isolasi, tabung reaksi, cawan petri, labu erlenmeyer, pipet, hot-plate, sentrifugasi, tabung valcon, jarum inokulasi,

dan lain-lain serta alat-alat yang digunakan untuk kegiatan hidrolisis dan analisis produknya.

### **3.3.2. Bahan**

Bahan-bahan utama yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah jamur entomopatogen hasil isolasi dan seleksi, larva Ulat Hongkong (*Tenebrio molitor*), Jangkrik (*Gryllus sp.*), tanah yang sudah disterilkan, kolodial kitin, medium kitin cair, medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) , medium *Potato Dextrose Broth* (PDB), reagen *Bradford*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), dan garam amonium phospat.

## **3.4. Prosedur Penelitian**

### **3.4.1. Tahap Persiapan**

Tahap ini meliputi persiapan alat dan bahan yang selanjutnya dilakukan proses sterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf sebelum digunakan dalam penelitian. Bahan yang perlu disterilisasi dimasukkan ke wadah kaca yang bersih dan diberi sumbat serta dibungkus oleh plastik sebelum di sterilisasi. Alat yang akan digunakan juga dibungkus dengan plastik, namun sebelumnya dilapisi dulu dengan kertas hingga rapat untuk menjaga agar tetap kering, setelah itu dilakukan sterilisasi dengan cara dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 – 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs. kegiatan ini dilakukan di dalam Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Kegiatan ini bertujuan untuk menjaga agar kegiatan penelitian dilakukan secara aseptik dan mencegah terjadinya kontaminasi dari mikroorganisme lain. Pada tahap persiapan dilakukan beberapa pembuatan reagen dan media yang akan digunakan adalah sebagai berikut:

#### **1) Reagen *Bradford***

Reagen *Bradford* dibuat dengan mencampurkan 100 mg Comassie Blue G - 250 dengan 100 ml H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dan 50ml etanol 100 %. Lalu larutan tersebut dilarutkan kedalam akuades hingga 1000ml. Setelahnya larutan disaring menggunakan kertas saring whattaman nomer 4 dan disimpan pada lemari pendingin dengan suhu 4 °C.

## **2) Larutan BSA 1 mg/ml**

Larutan standar BSA digunakan sebagai petakan untuk membuat kurva standar dibuat menggunakan cara melarutkan 100 mg BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan 100 ml akuades. Lalu larutan tersebut diaduk hingga homogen dan disimpan pada suhu 4 °C.

## **3) Pembuatan Media PDA**

Media PDA merupakan media yang digunakan sebagai media peremajaan jamur secara *in vitro*. Media PDA mengandung beberapa nutrisi yang dibutuhkan jamur pada umumnya yaitu *Potato* atau kentang sebagai sumber karbohidrat, *Dextrose* sebagai sumber gula, dan agar sebagai penyatu agar yang mengatur tekstur media. Media PDA dibuat dengan menggunakan bahan baku alami ataupun teknis yang sudah terkandung dalam satu bahan kimia buatan. Bahan baku alami yang terdiri dari (400 g kentang yg digunakan ekstraknya, 20 g *sukrosa/ dextrosa*, dan 17 g agar dilarutkan dalam 1000 mL aquades) biasa digunakan sebagai media peremajaan kultur jamur campuran, dikarenakan bahan alami belum memiliki standar baku kemurnian yg dibutuhkan. Sedangkan pada saat identifikasi dan kultur isolat murni digunakan bahan baku teknis berupa PDA yang sudah mengandung *Potato Dextrose Agar* dengan kemurnian yg sudah distandarisasi.

Media yang sudah dibuat akan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf yang bertujuan agar media tersebut bersih dari mikroorganisme lain selain isolat jamur yang akan dikultur.

## **4) Media PDB**

Media PDB dibuat sama seperti cara membuat PDA menggunakan bahan alami yaitu dengan melakukan ekstraksi kaldu kentang dengan merebus kentang sebanyak 400 g. Setelah didapatkan ekstrak kentang, dicampurkan dengan 20 g *dextrosa*. Media PDB dibuat tanpa menggunakan agar sehingga memiliki tekstur yang cair.

### 5) Pembuatan kolodial kitin

Bahan dasar pembuatan kolodial kitin ini adalah tepung kitin murni. Metode pembuatan kolodial kitin diadopsi dari artikel ilmiah K. Shimahara (1988, hlmn 164). Bahan kitin yang digunakan adalah sebagai sumber kitin (poly N-asetil glukosamin) sebagai zat utama yang diuraikan oleh enzim kitinase. Pertama-tama 5 g kitin dilarutkan kedalam 100 mL HCl pekat lalu dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirer* selama 2 jam. Setelah itu bahan disimpang selama 24 jam di lemari pendingin bersuhu 4°C selama 24 jam. Selanjutnya bahan dicampurkan dengan NaOH 10 N dan aquadest steril dingin hingga pH larutan menjadi netral. Larutan yang sudah netral tersebut disaring menggunakan *glass wolle* dan filtrat hasil penyaringan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi pelet yang mengendap dicuci dengan menggunakan aquadest steril lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan dan waktu yang sama. Dan endapan terakhir yang dihasilkan merupakan kolodial kitin yang siap digunakan untuk membuat media kitin cair dan bahan uji biokimia enzim kitinase.

### 6) Pembuatan media kitin cair

Media kitin cair mengandung garam-garam mineral dan kolodial kitin sebagai bahan baku utamanya. Adapun garam-garam mineral yang terkandung didalamnya adalah 125 mL kolodial kitin 0,3%; 0,65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25 g NaCl; 0,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,12 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; dan 0,005 g  $\text{CaCl}_2$ . Campuran ini dilarutkan kedalam 1000 mL aquadest steril. Pembuatan media harus dilakukan dalam keadaan aseptik untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

## 3.4.2. Tahap Penelitian

### 1) Isolasi Jamur dengan Perangkap Serangga

Jamur diisolasi menggunakan perangkap serangga. Serangga yang digunakan berupa larva ulat hongkong *Tenebrio molitor* atau yang biasa dikenal sebagai ulat hongkong. Lalu disiapkan tempat berupa baki yang didalamnya sudah dicampur dengan 25 g tanah dari kebun yang sudah dilakukan sterilisasi. Sejumlah 15 ekor larva ditaruh secara acak pada baki yang berisikan tanah. Baki ditaruh ditempat

yang teduh dan lembab. Selanjutnya baki dibiarkan selama 5 - 7 hari untuk memerangkap spora jamur entomopatogen untuk tumbuh dan menginfeksi larva.

## **2) Isolasi, Identifikasi, dan Seleksi Jamur Entomopatogen**

Jamur yang terpilih untuk digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *Beauveria bassiana*, *Trichoderma koningii*, dan *Aspergillus niger*. Jamur yang sudah terperangkap pada larva *T. molitor* dilakukan sterilisasi pada permukaannya menggunakan alkohol 70% selama tiga menit. Kemudian dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali lalu dikeringkan diatas kertas saring steril. Larva tersebut diletakan di cawan petri dengan disertakan tissue lembab, lalu dilakukan inkubasi selama  $\pm 7 \times 24$  jam. Setelah dilakukan inkubasi, larva yang ditumbuhi jamur akan dilakukan pemurnian isolat, isolat akan diidentifikasi lalu diseleksi. Pemurnian tersebut dilanjutkan dengan proses peremajaan pada media seleksi jamur.

## **3) Peremajaan Isolat Jamur**

Isolat jamur yang sudah dilakukan pemurnian dan identifikasi. Jamur yang terpilih diremajakan menggunakan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang sudah tersedia dan steril. Isolat jamur yang terpilih diinokulasikan pada media dan dilakukan didalam *laminar air flow* secara aseptik. Lalu isolat diinkubasi pada suhu ruang selama 4 – 5 hari.

#### 4) Aplikasi Jamur pada Serangga Uji secara In Vitro



*Gambar 3.1. Prototype uji aplikasi jamur entomopatogen*

(sumber: Dokumentasi Pribadi, 2018)

Jamur yang telah diisolasi akan diaplikasikan kembali pada serangga uji yaitu jangkrik *Gryllus* sp. yang merupakan aplikasi dari *postulat koch*. Pertama-tama serangga hama disiapkan pada kotak yang berisi tanah yang sudah dilakukan sterilisasi sebelumnya selanjutnya dilakukan aklimatisasi selama  $\pm 24$  jam.

Setelah aklimatisasi berakhir dilakukan aplikasi jamur pada serangga uji lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 7 x 24 jam.

$$\text{Presentasi Mortalitas Serangga} = \frac{\sum \text{serangga mati}}{\sum \text{keseluruhan serangga hidup}} \times 100 \%$$

#### 5) Produksi enzim kitinase

Produksi enzim kitinase dilakukan dengan mengkultur jamur pada media kitin cair. Isolat jamur entomopatogen yang sudah diremajakan diinokulasikan pada media kitin cair secara aseptik. Kultur tersebut diinkubasi pada inkubasi bergoyang dengan kecepatan 120 rpm selama 4 – 5 hari pada suhu ruang ( $\pm 25$  °C)

## 6) Purifikasi Parsial

Purifikasi parsial enzim kitinase dilakukan dalam dua tahapan utama, yaitu dengan pengendapan menggunakan buffer phosphate. Pertama - tama enzim kasar diperoleh dari hasil presipitasi menggunakan buffer fosfat dengan beberapa tingkatan yaitu 0, 10, 30, 50, dan 70 %. Dilakukan pengadukan pada proses penambahan amonium sulfat yang dilakukan sedikit demi sedikit dan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C. Selanjutnya sampel presipitasi disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Protein yang dihasilkan berupa pelet ditambahkan dengan 8 ml buffer fosfat pH 7. Suspensi protein disimpan pada suhu – 21°C untuk pengujian selanjutnya.

## 7) Uji Keberadaan Kitinase

Uji keberadaan kitinase dilakukan dengan menggunakan media kitin minimum cair. Isolat jamur diinokulasikan pada media kitin cair yang sudah disterilkan didalam tabung kultur. Inokulasi jamur dilakukan menggunakan *laminar air flow* secara aseptik. Setelah dilakukan inokulasi tabung kultur yang sudah berisikan isolat jamur diinkubasi menggunakan *shaker* pada suhu ruang dengan kecepatan  $\pm 150$  rpm dan dibiarkan selama  $\pm 7 \times 24$  jam.

## 8) Pengukuran Konsentrasi Enzim Kitinase Parsial

Kitinase merupakan enzim yang tersusun dari protein. Pengukuran total protein dilakukan menggunakan metode Bradford (1976). Pengukuran ini dilakukan dengan membuat kurva standar menggunakan BSA (Bovine Serum Albumin). Deret konsentrasi yang dibuat terdiri atas 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm. Larutan tersebut diuji menggunakan reagen Bradford yang terdiri dari campuran 100 mg *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 100 ml  $H_3PO_4$ , dan NaOH 1 M. Campuran uji dihomogenkan menggunakan vortex lalu diukur adsorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.



Kurva standar dibuat dengan cara menghubungkan standar dengan nilai adsorbansi terdekat. Adapun tabel pengerjaan kurva baku adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1.

## Prosedur Pembuatan Kurva Baku

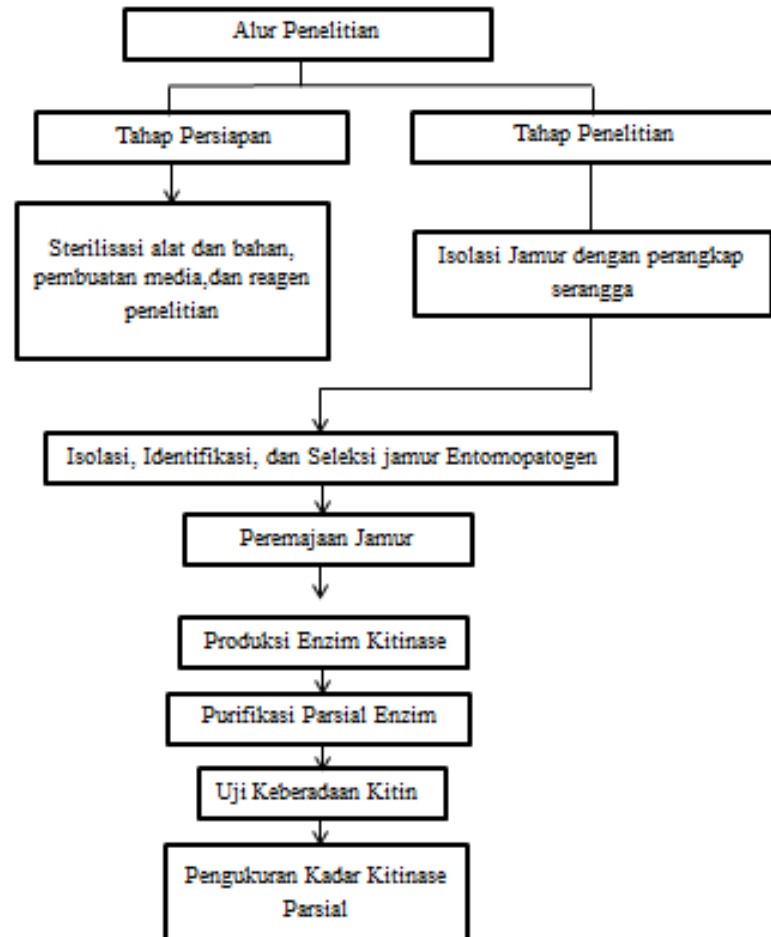
Blanko	1	2	3	4	5	6	7
Akuades (µl)	100	80	60	40	20	-	-
BSA 1 mg/ml (µl)	-	20	40	60	80	100	sample
Reagen Bradford	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Pengukuran konsentrasi protein pada sampel BSA dilakukan dengan mencampurkan 100 µl dengan 5000 µl reagen bradford. Sebelum perhitungan kadar sampel dilakukan, hal yang harus dilakukan sebelumnya adalah perhitungan kurva baku. Kurva baku dibuat menggunakan larutan BSA dengan konsentrasi bertingkat dan hasil dari pengukurannya dibuat kurva hingga garis yang terbentuk mempunyai bentuk yang linear. Setelah itu membuat persamaan regresi dari kurva baku untuk mendapatkan koefisien dan rumus perhitungan sampel selanjutnya. Sampel yang terhitung berupa protein. Prinsip kerja reagen *bradford* adalah sebagai mengikat protein dengan memberikan warna. Warna yang terbentuk pada perhitungan kurva baku merupakan jumlah protein yang terhitung, semakin pekat warna yang terbentuk maka akan semakin banyak kandungan protein yang terlarut.

Metode *Bradford* menekankan bahwa absorpsi spektrum dilakukan dalam dua bentuk pengujian secara bersamaan. Hal ini menyebabkan respon yang tidak linear pada kurva standar. Banyak pengguna metode *Bradford* dan peneliti menganggap bahwa respon yang dihasilkan adalah linear. Meskipun demikian, saat kurva standar digambarkan akan lebih mirip dengan kurva linier. Metode ini hanya akan

linier jika konsentrasi larutan standar maupun sampel yang digunakan kecil.  
(Rosenberg, 2004).

### 3.6. Alur Penelitian



Gambar 3.2. Alur Penelitian